

УДК 575.22+577.21:582.912.46

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ СОРТОВ ГОЛУБИКИ НА ОСНОВЕ CAPS-МАРКЕРОВ

¹ВОДЧИЦ Наталья Васильевна, м.н.с., зав. НИЛ КТР

²КУДРЯШОВА Оксана Александровна, в.н.с., к.б.н.

²ВОЛОТОВИЧ Антон Анатольевич, к.б.н., доцент

¹Полесский государственный университет

²Республиканский лесной селекционно-семеноводческий центр

Введение. С увеличением числа новых сортов голубики все более важным становится процесс регистрации посадочного материала, его сертификации и защиты авторских прав селекционеров [1 с. 92].

В настоящее время существует огромное количество различных типов молекулярных маркеров, которые применяются для анализа генетического полиморфизма и филогенетических отношений между видами, популяциями и отдельными индивидуумами [5 с. 206]. Преимуществами CAPS-маркеров являются: кодоминантный тип наследования, при котором не только гомо-, но и гетерозиготные генотипы четко отличаются друг от друга, простота идентификации получаемых результатов, так как продукты гидролиза четко представлены всего одним или несколькими фрагментами в геле и отсутствие необходимости использования дорогостоящего и сложного оборудования [5 с. 207].

Целью настоящей работы было выявить полиморфизм в элюированных мономорфных ISSR-фрагментах шести сортов голубики с помощью CAPS-анализа.

Материал и методы исследований. Исследования были проведены на базе научно-исследовательской лаборатории прикладной и фундаментальной биотехнологии биотехнологического факультета учреждения образования «Полесский государственный университет» (далее БТФ ПолесГУ).

Объектом исследования были полугодовые растения голубики щитковой – *Vaccinium corymbosum* L. (сорта Bluecrop, Reka, Denise blue и Bluejay) и 2 сорта от гибридизации *Vaccinium angustifolium* L. × *Vaccinium corymbosum* L. (Northland, Northblue), произведенные методом клонального микроразмножения *in vitro* на базе научно-исследовательской лаборатории клеточных технологий в растениеводстве БТФ ПолесГУ.

Мономорфные фрагменты, выявленные у шести сортов голубики, выделяли из агарозного геля с помощью центрифугирования. Элюированные фрагменты использовали как ДНК-матрицу в повторной ПЦР [2 с. 133].

CAPS-анализ проводили с использованием следующих эндонуклеаз рестрикции фирмы New England Biolabs: *Taq* I, *Hha* I, *Hind* III, *Hin*P1I, *Xba* I, *Pvu* II. Рестриктную обработку продуктов амплификации в количестве 7 мкл проводили в буфере согласно инструкций, прилагаемых фирмой производителем к каждой эндонуклеазе. Время инкубации для рестриктаз 2 – 4 часа при температуре 37°C, для *Taq* I-эндонуклеазы – при 65°C.

Для визуализации фрагментов ДНК, использовали горизонтальный электрофорез продуктов рестрикции [3 с. 116].

Результаты и их обсуждение. При проведении молекулярно-генетического сравнительного анализа ряда сортов голубики нами были выявлены 110 ISSR-фрагментов, из них 25 (22,7 %) являлись мономорфными. Для дальнейшего исследования были выбраны маркеры, полученные с помощью праймеров UBC 824, 808, 818 и 845 [3 с. 117].

Как правило, кодоминантные маркеры проявляют различия в размере электрофоретических полос, в то время как доминантные — в наличии или отсутствии таких полос. Строго говоря, различные формы проявления используемого молекулярного маркера, являются «аллелями» данного ДНК-маркера [4 с. 35].

После электрофоретического разделения продуктов амплификации с праймером UBC 824 у всех исследованных сортов голубики были выделены фрагменты соответствующие 535 п.н. каждый, которые в дальнейшем были обработаны шестью эндонуклеазами рестрикции. Обработка реампликонов *Taq* I эндонуклеазой способствовала отделению от основного фрагмента сорта Northblue дополнительного, размером 410 п.н. Поскольку после рестрикции остается как исходный фрагмент, так и появляется один дополнительный фрагмент меньшего размера, а также учитывая, что CAPS-маркеры являются кодоминантными и позволяют выявить оба аллеля, можно говорить о том, что гибрид Northblue является гетерозиготным, остальные пять сортов – растения с гомозиготными генотипами.

Точно так же продукты амплификации шести фрагментов голубики, соответствующие 510 п. н., полученные из ДНК сортов с праймером UBC 808, были обработаны эндонуклеазами рестрикции, разделены электрофорезом в агарозном геле и сопоставлены между собой. В ходе проделанной работы по наличию сайтов рестрикции был обнаружен полиморфизм у сортов Reka и Bluejay, выявленный опять же *Taq* I эндонуклеазой. В результате исследования отделились маркеры, соответствующие 440 п.н.

Возможно, из-за небольшой длины не был выявлен полиморфизм внутри фрагментов размером 300 п.н., полученных при ISSR-ПЦР-реакции с 818 праймером и обработанных эндонуклеазами рестрикции *Taq* I, *Hha* I и *Hin*PII и *Hind* III.

При визуализации результатов были обнаружены различия по мономорфным фрагментам, равным 615 п.н., полученным у шести сортов при амплификации с праймером UBC 818 и подвергшимся последующей рестрикции эндонуклеазой *Hin*PII. Гидролиз по сайту узнавания для данного фермента привел к отделению у сорта Northblue CAPS-маркера равного 500 п.н.

Так же были обработаны шестью эндонуклеазами рестрикции характерные для всех сортов фрагменты равные 505 п.н. и 705 п.н., полученные с помощью праймера 845; 715 и 890, выявленные праймером UBC 824; 1060 п.н. детектируемые с праймером UBC 818, но полиморфизм выявлен не был.

Заключение. В результате CAPS-анализа исходно предположительно мономорфные ISSR-фрагменты обнаруживают полиморфность на уровне нуклеотидных сиквенсов. На основании этого разработаны четыре CAPS-маркера для трех сортов голубики. Полученные маркеры основаны на наличии четырехнуклеотидного локуса узнавания для эндонуклеаз рестрикции *Taq* I и *Hin*PII. Кодоминантные маркеры с полиморфизмом по длине ISSR-ПЦР-фрагментов можно использовать как дополнительный источник информации при типировании растений, для выявления генетического внутривидового полиморфизма и для филогенетических исследований.

Список использованных источников

1. Бобошина, И. В. Идентификация перспективных для Урала сортов пшеницы мягкой с использованием межмикросателлитного анализа полиморфизма ДНК / И. В. Бобошина, С. В. Боронникова // Фунд. исслед. – 2013. – № 6 (1). – С. 92-97.
2. Водчиц, Н.В. Применение CAPS-анализа ISSR-маркеров при типировании сортов голубики высокой / Н.В. Водчиц, Е.О. Юрченко, А.А. Волотович // Веснік ГрГУ. Серія 5. Економіка. Сацьялогія. Біялогія. – 2016. – Т. 6. – № 3. – С. 132-139.
3. Водчиц, Н.В. Применение ISSR-маркеров для генетической паспортизации и сертификации растений рода *Vaccinium* / Н.В. Водчиц // Весці НАНБ. Сер. біял. навук – 2016. – № 3. – С. 115-120.
4. Чесноков, Ю.В. Генетические ресурсы растений и ускорение селекционного процесса / Ю.В. Чесноков, В.М. Косолапов. – Москва : ООО «Угрешская типография», 2016. – 172 с.
5. Шавруков, Ю.Н. CAPS-маркеры в биологии растений / Ю.Н. Шавруков // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015. – № 19(2). – С. 19-34.